УДК: 612.323+577.175.73+616.33-002.27

О. Цирюк, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ПОШУК ЗАСОБІВ КОРЕКЦІЇ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН В ШЛУНКУ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОАЦИДНОСТІ

Встановлено, що гіпергастринемія, викликана введенням щурам омепразолу впродовж 28 днів, призводить до загальної гіперплазії слизової оболонки шлунка,внаслідок чого підвищується її здатність виробляти кислоту. Компенсаторний вплив агоністів PPARγ (піоглітазону, меланіну) та мультипробіотика "Симбітер" на рівень шлункової секреції кислоти вказує на уповільнення процесу гіпертрофії слизової оболонки, викликаної гіпергастринемією. Таким чином, агоністи PPARγ та мультипробіотик "Симбітер" є перспективними і ефективними засобами попередження негативних структурно-функціональних змін у слизовій оболонці шлунка.

Ключові слова: секреція шлункового соку, омепразол, гастрин, активатор проліферації пероксисом рецепторів гамма, мультипробіотик.

Вступ. Гастрин, як традиційний гормон, синтезується та виділяється з G-клітин антрального відділу шлунка та стимулює секрецію соляної кислоти в шлунку. Гіпергастринемія розвивається внаслідок зниження кислотності шлункового соку, причиною якої є атрофічні гастрити та тривалий прийом антисекреторних препаратів [2]. Тривала гіпергастринемія викликає новоутворення, які походять з ECL-клітин [7,15], які можуть започатковувати шлункові карциноми дифузного типу, частота яких збільшилась упродовж останніх десятиліть [22].

У зв'язку із відсутністю засобів профілактики структурно-функціональних змін у шлунку на фоні тривалого зниження секреції соляної кислоти, актуальним є пошук засобів профілактики трофічної дії гастрину.

Так як дія гастрину на клітини-мішені реалізується через гастрин/холецистокінінові рецептори (ГХР), на першому етапі наших досліджень ми вважали перспективним у профілактиці трофічної дії гастрину застосування блокатора ГХР проглуміду.

Нещодавно було показано, що гастрин може опосередковувати свою трофічну дію через пригнічення ядерних рецепторів-активаторів проліферації пероксисом типу гамма (PPARγ), зменшуючи їх експресію як в нормальній тканині товстого кишечника, так і в тканинах колоректальної карциноми, аденомах товстого кишечника, тощо [8]. У зв'язку з цим наші дослідження були спрямовані на дослідження агоністів PPARγ як можливих засобів профілактики розвитку гіперплазії в слизовій оболонці шлунка щурів, викликаної тривалою гіпергастринемією. В якості агоністів PPARγ нашу увагу привернули піоглітазон, один із представників групи тіазолідиндіонів, із групипрепаратів, що використовуються в клінічній практиці для лікування хворих з цукровим діабетом II типу, та природний полімер фенольних сполук меланін [19], продуцентом якого є чорні дріжджі *Nadsoniella nigra* штам X-1. Останні висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська Антарктична станція академік Вернадський), які надані нам Національним антарктичним науковим центром України згідно договору №07ДФ036-08.

Зниження секреції соляної кислоти не тільки призводить до гіпергастринемії, але і сприяє посиленню колонізації шлунка різноманітними мікроорганізмами, так як соляна кислота є найголовнішим фактором захисту проти бактеріальної колонізації, попереджаючи розвиток синдрому посиленого росту бактерій та кишкових інфекцій [1]. Показаний взаємозв'язок між бактеріальним інфікуванням шлунку та секрецією гастрину [23]. Так, колонізація шлунку *Helicobacter pylori* (H. pylori) запускає імунну відповідь Т-хелперів першого порядку (Th-1) [11] з вивільненням головного Th-1 цитокіну – інтерферону-гамма (ІФН-γ), який стимулює секрецію гастрину [16]. А бактеріальний білок (OmpA-подібний білок), ізольований і клонований із *Acinetobacter spp.*, прямо посилює експресію генів гастрину. Таким чином, усунення дисбіозу в шлунку за допомогою мультипробіотика "Симбітер®" ацидофільний концентрований є перспективним шляхом профілактики трофічної дії гастрину в умовах тривалої гіпоацидності.

Мета роботи полягала у дослідженні ефективності блокатора ГХР проглуміду, агоністів PPARγ та мультипробіотика "Симбітер®" в усуненні негативних наслідків тривалого зниження секреції соляної кислоти в шлунку.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведені на 84 білих нелінійних щурах, самцях вагою 180-220 г. згідно етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародним угодам та національному законодавству у цій галузі [4].

Проведено 4 серії експериментів, кожна з яких включала контрольну групу щурів, яким упродовж 28 днів вводили 0,2 мл води, та групу щурів, яким упродовж 28 днів вводили омепразол (Sigma Chemichal Co, St. Louis, USA) (14 мг/кг, внутрішньочеревинно (в/о), розчиненого в 0,2 мл води). Серії досліджень різнились між собою лише третьою групою тварин, яким упродовж 28 днів одночасно вводили відповідно омепразол та блокатор ГХР проглумід (10 мг/кг, в/о), омепразол та агоніст PPARγ піоглітазон (" Мікро Лабс Лімітед", 30 мг/кг, per os), омепразол та меланін (0,1 мг/кг per os), що проявляє властивості агоніста PPARγ, омепразол та мультипробіотик "Симбітер® ацидофільний концентрований (ТОВ "О.Д. Пролісок", Україна, 0,14 мл/кг, per os).

Через добу після останнього введення досліджуваних речовин або води проводили експеримент, в якому визначали рівень базальної секреції кислоти в шлунку методом перфузії ізольованого шлунку за Гхошем та Шільдом [14] під уретановим знечуленням (Sigma Chemichal Co, St. Louis, USA) (1,15 г/кг, в/о). Гастрин в плазмі крові визначали радіоімунним методом із використанням аналітичного набору фірми "MP Biomedicals, LLC" (USA).

Одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W тесту Шапіро-Вілка. Оскільки дані виявилися нормально розподіленими, порівняння вибірок проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Розраховували середнє значення (M), стандартне відхилення (SD). Рівень значущості приймали $p<0,05$ [5].

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що через добу після 28 днів введення щурам омепразолу концентрація гастрину в плазмі крові збільшувалась на 189,3% ($p<0,05$) (рис.1).

© Цирюк О., Берегова Т., 2014

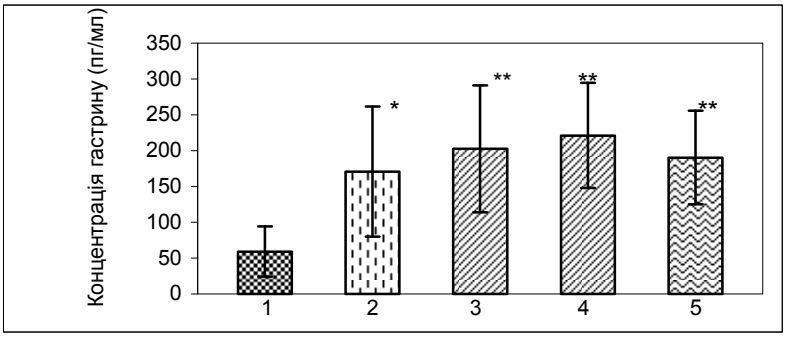

Рис. 1. Концентрація гастрину в плазмі крові, (M±SD):
1 – контроль; 2 – омепразол; 3 – омепразол + проглумід; 4 – омепразол + піоглітазон; 5 – омепразол + меланін;
*** – p < 0,05; ** – p < 0,01 у порівнянні з контролем**

Одночасно на 173,9% (p<0,001) зростав дебіт кислоти базальної шлункової секреції (рис.2), що, як показано нами та іншими дослідниками [6, 13, 21], є результатом розвитку гіперплазії ентерохромафіноподібних та парієтальних клітин у відповідь на гіпергастринемію, викликану тривалим пригніченням секреції соляної кислоти. Зроблено припущення, що карциноїдні пухлини в шлунку розвиваються внаслідок прогресуючих гастринстимульованих подій: від зростаючої гіперплазії ентерохромафіноподібних клітин до дисплазії та формування карциноїду [20].

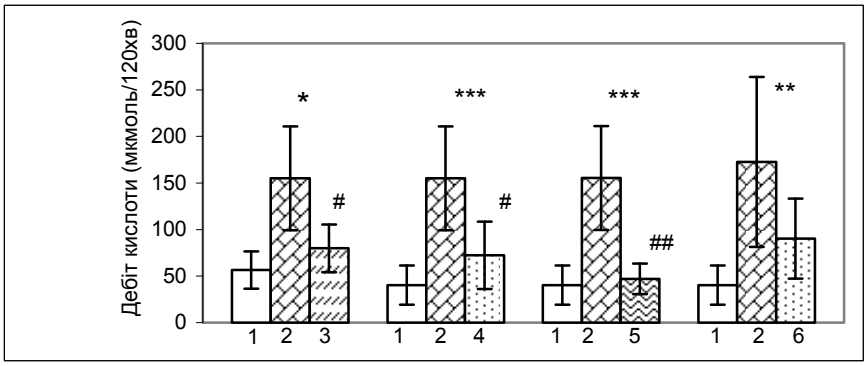

Рис. 2. Базальна шлункова секреція кислоти у щурів після 28-денного ізольованого та сумісного введення омепразолу (14мг/кг), (M±SD):
1 – контроль; 2 – омепразол; 3 – омепразол+проглумід (10 мг/кг); 4 – омепразол+піоглітазон (30 мг/кг, per os); 5 – омепразол+меланін (0,1 мг/кг, per os); 6 – омепразол+"Симбітер" (0,14 мл/кг); * – p<0,05, * – p<0,001 у порівнянні з контролем (група 1), # – p<0,05, ## – p<0,01 у порівнянні з омепразолом (група 2)**

Через добу після одночасного 28 денного введення щурам проглуміду та омепразолу дебіт базальної секреції кислоти статистично значущо не відрізнявся від контролю (рис.2), що свідчить про відсутність помітних змін в парієтальних клітинах, не дивлячись на те, що гіпергастринемія зберігалась (рис.1). На користь нашого висновку свідчать роботи, в яких показана відсутність гістологічних змін в слизовій оболонці шлунка щурів за умов одночасного 28 денного введення омепразолу та проглуміду [1]. Таким чином, здається доцільним за умов необхідності тривалого прийому блокаторів протонної помпи або у людей із гіпергастринемією різного ґенезу (гіпоацидність шлункового соку, ахілія, синдром Золінгера-Еллісона, атрофічні гастрити) призначати блокатор ГХР проглумід з метою запобігання трофічної дії гастрину, а значить профілактики гіперплазії клітин слизової оболонки шлунка. Зважаючи на роль гастрину та холецистокініну в регуляції секреції жовчі та стимуляції моторики жовчного міхура [18, 24], зроблено висновок про неможливість тривалого застосування блокатора ГХР з метою профілактики гіперплазії клітин слизової оболонки шлунка. За умов одночасного 28 денного введення агоністів PPARγ (піоглітазону або меланіну) з омепразолом дебіт кислоти базальної шлункової секреції статистично значуще не відрізнявся від контролю (рис.2) на фоні вираженої гіпергастринемії (рис.1). Так як секреція кислоти в шлунку залежить від кількості та розміру парієтальних клітин, ми дійшли висновку, що за умов одночасного введення агоністів PPARγ та омепразолу явище гіперплазії було менш вираженим або відсутнім. На користь нашого висновку свідчать дані літератури про те, що активація PPARγ в умовах *in vitro* та *in vivo* стимулює термінальну диференціацію первинних клітин ліпосаркоми людини, які характеризується накопиченням внутрішньоклітинних ліпідів, та індукцією адипоцитспецифічних генів [9]. У хворих на рак молочної залози, активація PPARγ є причиною акумулювання ліпідів і змін у експресії генів злоякісних епітеліальних клітин молочних залоз, пов'язаних із переходом до більш диференційованих, і відповідно, менш злоякісних форм пухлин [17]. А у клітинних лініях раку підшлункової залози агоністи PPARγ збільшують рівень маркерів диференціації [10].

При дослідженні базальної шлункової секреції у щурів з комбінованим веденням омепразолу та мультипробіотика "Симбітер" спостерігалось зменшення базальної шлункової секреції на 47,6% у порівнянні з групою, що отримувала лише омепразол (рис.2). Позитивний вплив "Симбітеру" на секреторну функцію шлунка, як показника стану парієтальних клітин, є результатом нормалізації якісного та кількісного складу мікрофлори шлунка [1], зниження рівня ІФН-γ, який робить певний

внесок у розвиток гіпергастринемії [3], та через активацію PPARγ, яку викликають певні штами мікроорганізмів [12], що входять до складу "Симбітеру".

Висновки:

Наші дані дозволяють зробити висновок, що: 1) гіпергастринемія, викликана 28 денним веденням омепразолу щурам, призводить до загальної гіперплазії слизової оболонки шлунка, і така слизова оболонка має підвищену здатність виробляти кислоту; 2) компенсаторний вплив агоністів PPARγ піоглітазону, меланіну та мультипробіотика "Симбітер" на рівень шлункової секреції кислоти вказує на уповільнення процесу гіпертрофії слизової оболонки, викликаної гіпергастринемією. Таким чином, агоністи PPARγ та мультипробіотик "Симбітер" є перспективними і ефективними засобами попередження структурно-функціональних змін в слизовій оболонці шлунка.

Список використаних джерел

1. Берегова Т.В., Цирюк О.І. Мультипробіотик "Симбітер" як засіб профілактики структурно-морфологічних змін в шлунку, що виникають на фоні зниженої кислотності шлункового соку // Збірник праць Сателітного симпозіуму "Сучасні аспекти застосування пробіотиків в педіатрії". – 2008. – С.52-57.

2. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Перспективы применения блокаторов протонного насоса в гастроэнтерологии // Болезни органов пищеварения. – 2001, – Т. 3, №1 – С.78-84.

3. Короткий О., Пилипенко С., Компанець І., Цирюк О., Остапченко Л., Берегова Т.В. Вплив мультипробіотиків на вміст інтерферону-гамма в сироватці крові щурів за умов тривалої гіпоацидності // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2009 – №54. – С. 47-49.

4. Мальцев В.И. Этическая оценка методик проведения исследований / Мальцев В.И., Белоусов Д.Ю. // Еженедельник Аптека. – 2001. – № 34. – С. 35.

5. Філімонова Н.Б., Філь І.О., Михайлова Т.С. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту // Медицина залізничного транспорту України.-2004. – №4. – С.85-93.

6. Цирюк О.І., Берегова Т.В. Вплив омепразол-викликаної гіпергастринемії на базальну шлункову секрецію у щурів // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – №3. – С. 38-43.

7. Bamba T., Kosugi S., Kanda T., Tsubono T., Sakai Y, Musha N. Multiple carcinoids in the duodenum, pancreas and stomach accompanied with type A gastritis: a case report // Gastroenterol. – 2007. – Vol. 13, №15. – P. 2247-2249.

8. Chang A.J., Song D.H. and Wolfe M.M. Attenuation of peroxisome roliferator-activated receptor γ (PPARγ) Mediates Gastrin-stimulated Colorectal Cancer Cell Proliferation // The Journ of Biol Chem. – 2006. – Vol. 281, №21. – P.14700–14710.

9. Demetri G.D., Fletcher C.D., Mueller E. et al. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. –1999. – Vol. 96, № 7. – P.3951-3956.

10. Elnemr A., Ohta T., Iwata K., Ninomia I., Fushida S. PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells // Int.J.Oncol. – 2000. – Vol. 17, № 6. – P.1157-1164.

11. Ernst P.B., Gold B.D. The disease spectrum of Helicobacter pylori: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer // Annu. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 615-640.

12. Ewaschuk J.B., Walker J.W., Diaz H. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice // J. Nutrition. – 2006. – Vol. 136.- P.1483-1487.

13. Frucht, H., Maton P. N., Jensen R. T. Use of omeprazole in patients with the Zollinger-Ellison syndrome // Dig. Dis. Sci – 1991. – Vol. 36. – P. 394–404.

14. Ghosh M.N., Shild H.O. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat // Br. J. Pharmacol. – 1958. – P. 13-14.

15. Jensen R.T. Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas // Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.-2006.- Vol. 98, № 1.-P.4-19.

16. Lehmann F.S., Golodner E.H., Wang J., Chen M.C., Avedian D., Calam J., Walsh J.H., Dubinett S., Soll A.H. Mononuclear cells and cytokines stimulate gastrin release from canine antral cells in primary culture // Am J Physiol. – 1996. – Vol. 270. – P. 783-788.

17. Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma // Mol.Cell. – 1998. – Vol. 1, № 3. – P.465-470.

18. Otsuki M. Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. // J Gastroenterol Hepatol. – 2000. – Vol. 15 – P.71-83.

19. Plonska P., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects // Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol.53, № 3. – P. 429-443.

20. Solcia E., Rindi G., LaRosa S., Capella C. Morphological, molecular, and prognostic aspects of gastric endocrine tumors // Microsc. Res. Tech. – 2000. – Vol. 48 – P. 339–348.

21. Tsyryuk O., Radchuk O., Rybalchenko V., Beregova T. The influence of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" on structurally functional state of gastric mucosa in omeprazole-treated rats // Annales universitatis Mariae Curie-Sklodowska. – Lublin-Polonia. – Vol.XXI. – N.1,46, 2008. – P.257-260.

22. Waldum H.L., Brenna E., Sandvik A.K. Long-term safety of proton pump inhibitors: risks of gastric neoplasia and infections. // Expert Opin Drug Saf. – 2002. Vol.1, № 1. – P.29-38.

23. Zavros Y., Rieder G., Ferguson A., Mershant J.L. Gastritis and hypergastrinemia due to Acinobacter lwofii in mice // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70. – P. 2630-2639.

24. Zheng Q., Chen Y. The effects of cholecystojejunostomy and biliary drainage on biliary motor. // J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. – 2002. – Vol. 22, № 2. – P.144-147.

Надійшла до редколегії 19.06.14

Е. Цирюк, канд. биол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ПОИСК СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЖЕЛУДКЕ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОАЦИДНОСТИ

Установлено, что гипергастринемия вызванная введением крысам омепразола в течение 28 дней, приводит к общей гиперплазии слизистой оболочки желудка, и такая слизистая имеет повышеную способность вырабатывать кислоту. Компенсаторное влияние агонистов PPARγ (пиоглитазона, меланина) и мультипробиотика "Симбитер" на уровень желудочной секреции указывает на замедление процесса гипертрофии слизистой оболочки, вызванной гипергастринемией. Таким образом, агонисты PPARγ и мультипробиотик "Симбитер" есть перспективными и эффективными средствами в профилактике структурно-функциональных изменений в слизистой оболочке желудка.

Ключевые слова: желудочная секреция соляной кислоты, омепразол, гастрин, гамма рецепторы активаторов пролиферации пероксисом, мультипробиотик.

O. Tsyryuk, PhD., T. Beregova, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

FINDING WAYS OF CORRECTION THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE STOMACH UNDER PROLONGED HYPOACIDITY

It was established that hypergastrinemia in rats evoked by 28 days injection of omeprazole, leads to total hyperplasia of gastric mucosa and this mucosa has enhanced ability to produce hydrochloric acid. It was shown compensatory influence of peroxisome proliferator-activated receptors gamma agonists (pioglitazone, melanin) and multiprobiotic "Symbiter® acidophilic concentrated" on the level of gastric acid secretion. This testifies to the slowing-down of process of gastric mucosa hypertrophy, evoked by hypergastrinemia. Thus of peroxisome proliferator-activated receptors gamma agonists and multiprobiotic "Symbiter" are perspective and effective agents in prevention of structural and functional changes in gastric mucosa.

Key words: gastric acid secretion, omeprasole, gastrin, peroxisome proliferator-activated receptors gamma, multiprobiotic.